

DÉRIVÉS GÉNÉTIQUES SOUS PRESSIONS VACCINALES

Campagnes intensives de vaccination avec le vaccin polio oral : quelles répercussions sur le monde des entérovirus ?

F. Delpeyroux, S. Guillot, A. Szendrői, J. Balanant, V. Caro, N. Cuervo, S. Chevaliez, G. Dahourou, R. Crainic et le Groupe d'étude entérovirus*.

Epidémiologie moléculaire des entérovirus, Institut Pasteur, Paris et le Réseau International des Instituts Pasteur et Instituts Associés.

Francis Delpeyroux, Epidémiologie moléculaire des entérovirus, Institut Pasteur, 75724 Paris cedex 15, France. Tél: 33 1 40 61 33 22 ; delpeyro@pasteur.fr

* Groupe d'étude entérovirus : Oprisan G, Aubert Combiescu A, Combiescu M, Otelea D - Institut Cantacuzene, Roumanie. Spirou N, Markoulatos P - Institut Pasteur (IP) Héliénique, Athènes, Grèce. Romanenkova N - IP St Petersburg, Russie. Triki H - IP Tunis, Tunisie. Seghier M - IP Alger, Algérie. Gouandjika I, Morvan J - IP Bangui, République Centrafricaine. Dosseh A - IP Dakar, Sénégal. Akoua-Koffi C - IP Côte d'Ivoire. Rakoto Andrianarivelo M - IP Madagascar. Phan van Tu - IP Ho Chi Minh ville, Vietnam. Nguyen Hienh Thanh - IP Hanoi, Vietnam.

Manuscrit n° 2155/RIP2. 3e colloque du réseau international des Instituts Pasteur et instituts associés. 14-15 octobre 1999, Institut Pasteur de Paris.

Summary: What are the repercussions of the oral polio vaccine on the world of enteroviruses?

To eradicate poliomyelitis and poliovirus, intensive vaccination campaigns with oral polio-vaccine (OPV) have been organised. Eradication campaigns may well be successful because the antiviral immunity and the local intestinal immunity due to OPV in particular avoids and/or limits poliovirus circulation. These campaigns give interesting opportunities for studying the impact of viral vaccines on the viral world in terms of ecological and genetic virology. The pre-eradication phase we are now entering brings with it two kinds of problems.

First, the major disadvantage of OPV is the genetic and phenotypic variability of the vaccine strains. This variability leads to the spread of potentially pathogenic strains, which can be implicated in vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP). Genetic changes are characterised by point mutations and by genetic exchanges among OPV strains, between OPV and wild strains and perhaps between poliovirus and non-polio enteroviruses (ENPV). The fact that a few OPV mutant strains have been shown to multiply and/or to circulate for long periods suggests that OPV could sustain a reservoir of pathogenic poliovirus strains.

Second, there are ecological considerations. The disappearance of wild poliovirus through OPV vaccination could be due not only to antiviral local immunity but also to competition between OPV strains and wild strains for infecting the digest tract. Moreover, a competition between OPV and other enteroviruses may take place in a common ecological niche. To our knowledge, the possible impact of intensive OPV vaccination campaigns on the ENPV populations has never been considered. Because the goal of poliovirus eradication may be reached in the near future, there is worry as to the possible evolution of ENPV towards highly epidemic and pathogenic strains. This is leading those laboratories involved in poliomyelitis surveillance not only to search for remaining wild poliovirus strains but also to study the possible long-term circulation of OPV strains and to develop efficient ENPV surveillance.

Résumé :

Les campagnes de vaccination intensive avec le vaccin polio oral (VPO) qui visent à éradiquer poliomyélite et poliovirus sont, pour le virologue, un champ d'investigation unique pour évaluer l'influence sur le monde des virus de souches vaccinales développées par l'homme. Le succès de l'opération est envisageable car l'immunité antivirale et notamment intestinale établie grâce au VPO limite la circulation du virus. Dans la phase de pré-éradication de la poliomyélite qui s'amorce avec le nouveau millénaire, se posent cependant deux problèmes de génétique et d'écologie virale qui pourraient compromettre l'opération, sinon amoindrir les bénéfices attendus.

D'une part, la mise en évidence de quelques souches vaccinales mutantes ayant circulé durant une longue période suggère que le VPO pourrait entretenir un réservoir de souches pathogènes et être un obstacle à l'éradication du virus. D'autre part, dans le cas où l'éradication de la poliomyélite serait cependant établie, il paraît dorénavant souhaitable d'anticiper sur l'évolution des entérovirus dans un monde sans poliovirus, et d'évaluer dans quelle mesure les entérovirus non-polio (ENPV) pourraient être à l'origine de nouvelles souches épidémiques particulièrement pathogènes pour l'homme. Ces considérations conduisent les laboratoires impliqués dans la surveillance de la poliomyélite à s'intéresser non seulement à la détection des dernières souches sauvages mais également à la circulation des souches vaccinales ainsi qu'à la mise en place des programmes de veille micro-biologique pour les ENPV.

poliomyelitis
eradication
live vaccine
enterovirus
ecological virology
viral genetics

poliomyélite
éradication
vaccin vivant
entérovirus
écologie virale
génétique

Entérovirus et poliovirus

Les entérovirus humains, poliovirus, coxsackievirus et léchovirus (64 sérotypes connus) appartiennent à la famille des *Picornaviridae*. Ce sont des virus non enveloppés dont le génome est une molécule d'ARN de polarité positive protégée par une capsid de symétrie icosaédrique. Virus à transmission essentiellement féco-orale, ils se multiplient abondamment dans le tractus digestif et plus particulièrement dans l'intestin grêle. Cette multiplication aboutit à l'excrétion prolongée du virus dans les selles - jusqu'à 17 semaines chez l'homme - les titres infectieux pouvant atteindre 10⁶ unités infectieuses par gramme de selles (15).

Les entérovirus sont à l'origine d'infections souvent inapparentes. Cependant, ces virus peuvent provoquer une virémie et favoriser ainsi l'infection d'organes cibles secondaires, cœur ou système nerveux central (SNC) par exemple. Ce sont ces infections secondaires qui sont généralement responsables des pathologies diverses observées. Celles-ci se manifestent par des exanthèmes, herpangines (éruptions vésiculeuses de la gorge), maladies aiguës du système respiratoire ou conjonctivites. Ces virus peuvent être également responsables de pathologies aiguës graves telles que myopéricardites, méningites, encéphalites, maladies paralytiques et infection généralisée mortelle du nouveau-né. Certains d'entre eux sont suspectés d'être à l'origine de pathologies chroniques telles que myocardioopathie dilatée et diabète (figure 1) (18).

Figure 1.

Exemples de pathologies associées aux infections par les entérovirus.
Examples of pathologies associated with infections by enteroviruses.

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Coxsackievirus A (types 1-24) <ul style="list-style-type: none"> - diarrhée (18,20-22,24) - rhume (21,24) - herpangine (2-6,8,10) - pieds-mains-bouche (5,10,16) - conjonctivite hémorragique (24) - méningite aseptique (2,4,7,9,10) • Coxsackievirus B (types 1-6) <ul style="list-style-type: none"> - pleurodynie (1-5) - péricardites, myocardites (1-5) - diabète insulino-dépendant (4,5) - méningite aseptique (1-6) | <ul style="list-style-type: none"> • Echovirus (types 1-34) <ul style="list-style-type: none"> - exanthème (2,4,6,9,11,30) - méningite aseptique (1-34) - encéphalites (2,6,9,19) - paralysies (4,6,9,11,30) • Entérovirus (types 68-71) <ul style="list-style-type: none"> - pieds-mains-bouche (71) - conjonctivite hémorragique (70) - encéphalites (70,71) - paralysies (70,71) • Poliovirus (types 1-3) <ul style="list-style-type: none"> - paralysies (1-3) |
|---|---|

Les principaux sérotypes impliqués dans chacune des maladies ou syndromes sont indiqués entre parenthèses.

Le poliovirus (PV), l'un des virus à ARN les mieux caractérisés, est un modèle pour l'étude des virus à ARN non-rétroviraux en général, et des entérovirus en particulier (17). Le PV, dont il existe trois sérotypes, se multiplie dans le tractus digestif et peut dans un nombre de cas limité (environ 1 % des cas) atteindre le SNC dans lequel il détruit le neurone moteur, engendrant la poliomyélite paralytique aiguë. Si l'homme est le seul hôte naturel du PV, la poliomyélite peut être reproduite expérimentalement chez le singe; la construction récente de souris transgéniques porteuses du récepteur humain du PV donne maintenant accès à un modèle animal aisé pour l'étude du pouvoir pathogène du virus.

Prophylaxie de la poliomyélite

La prophylaxie de la poliomyélite est réalisée par l'emploi en parallèle de deux types de vaccins: le vaccin inactivé mis au point par SALK en 1953 et le vaccin atténué oral (VPO) développé par SABIN en 1955. Les souches atténuées (Sabin 1, 2 & 3) du VPO ont conservé la propriété d'infecter le tractus

intestinal mais ont perdu la capacité d'atteindre le SNC. Ces souches ont été obtenues par passages successifs, *in vitro* et *in vivo*, de PV sauvages (21). Leur atténuation est due à l'accumulation de mutations ponctuelles dans le génome viral (16). Par sa capacité à conférer une immunité intestinale solide, le VPO est considéré comme le vaccin de l'éradication: son emploi pourrait en effet permettre d'interrompre la transmission du PV sauvage et d'éradiquer la poliomyélite. Cependant, la multiplication dans l'intestin des souches vaccinales, comme, par ailleurs, celle des souches sauvages, s'accompagne d'une libération importante de particules virales dans l'environnement. En raison de la dérive génétique du PV, les virus dérivés des souches vaccinales présentent en général un phénotype pathogène après multiplication dans l'intestin et peuvent être à l'origine de rares cas de poliomyélite associée à la vaccination (PPAV). La multiplication massive des souches vaccinales du VPO dans l'intestin et la réversion de déterminants d'atténuation vers la virulence après la vaccination (dès 48 heures pour la souche Sabin 3) conduisent donc à une contamination importante des selles et de l'environnement par des souches de PV pathogènes.

Surveillance de la poliomyélite et des entérovirus

Les activités de surveillance virologique liées aux campagnes de vaccination intensive contre la poliomyélite consistent à rechercher et à différencier souches de PV sauvages ou vaccinales et autres entérovirus (10). Si cette activité de surveillance est suffisante pour décréter la disparition des souches sauvages de PV (comme c'est déjà le cas sur le continent américain), toute décision d'arrêter la vaccination contre la poliomyélite demande cependant à connaître au mieux l'évolution des souches vaccinales de PV dans l'environnement, leur capacité à circuler à long terme et à entretenir ainsi un réservoir de nouvelles souches pathogènes. La survie à long terme après l'arrêt de la vaccination de quelques souches pathogènes de PV, au sein d'une population non-protégée en pleine expansion, pourrait avoir des conséquences dramatiques. L'Organisation mondiale de la santé, qui a en charge la mise en place du programme pour l'éradication de la poliomyélite, fait état de telles préoccupations (Global eradication of poliomyelitis, 1998, publication WHO/EPI/GEN/98.12) et appelle à mettre au point des méthodes de surveillance de l'environnement, applicables avant et après l'arrêt de la vaccination, pour contrôler le succès de l'opération. Ces activités de surveillance virologique, liées aux campagnes de vaccination et à la recherche clinique, mettent à la disposition du virologue un nombre considérable de souches de PV, d'origine vaccinale ou sauvage, et d'autres entérovirus non-PV (ENPV); ces isolats viraux constituent un matériel unique pour apprécier, en termes d'écologie et de génétique virale, l'influence sur le monde des virus de souches vaccinales développées par l'homme. Les souches du VPO et leurs variants pathogènes sont un modèle pour étudier la circulation et l'évolution des souches d'entérovirus.

Variabilité génétique et évolution des entérovirus: l'exemple des souches du VPO

La multiplication des souches vaccinales dans l'intestin est concomitante de la réversion de déterminants d'atténuation vers la virulence, dès les premiers jours qui suivent la

vaccination. L'analyse des caractéristiques génomiques de nombreuses souches de PV pathogènes isolées chez des patients atteints de PPAV mais aussi chez des vaccinés sains, met en évidence des mutations ponctuelles qui affectent, entre autres, les déterminants génétiques impliqués dans l'atténuation des souches vaccinales (1). Les déterminants majeurs de l'atténuation sont localisés dans la région 5' non codante (5'NC) du génome qui contrôle l'initiation de la traduction du génome viral et dans les régions qui codent les protéines de la capsid virale.

Dans le but de parfaire nos connaissances sur la dérive génétique et phénotypique des virus vaccinaux du VPO, nous avons étudié des souches Sabin 1 isolées de patients atteints de PPAV. Lorsqu'elles ont été inoculées à des souris transgéniques qui expriment le récepteur humain du virus, la plupart de ces souches se sont avérées avoir perdu le caractère atténué de la souche originale. Le caractère neurovirulent modéré de quatre d'entre elles était lié à la présence de mutations dans la région 5'NC du génome viral. La mise en évidence, chez un des patients, d'une souche plus neurovirulente qui, tout en conservant de nombreux marqueurs nucléotidiques spécifiques de la souche Sabin 1 originale, différait de cette dernière par 71 mutations, indiquait qu'une souche vaccinale peut survivre ou circuler pendant une longue période chez les vaccinés. Quelques autres souches similaires ont été récemment décrites, notamment une souche de poliovirus de type 1 vaccinale ayant persisté pendant de nombreuses années chez un patient immunodéficient. L'étude de cet isolat a permis d'établir une horloge moléculaire à environ 1 % de nucléotides mutés par an (12). Dans le contexte des programmes de vaccination visant à éradiquer la poliomyélite et le PV, ces résultats mettent en avant la nécessité de tenir compte de la circulation éventuelle à long terme de souches pathogènes d'origine vaccinale (5). Le caractère fréquent ou exceptionnel de ce type de circulation prolongée reste à déterminer.

Échanges génétiques entre entérovirus

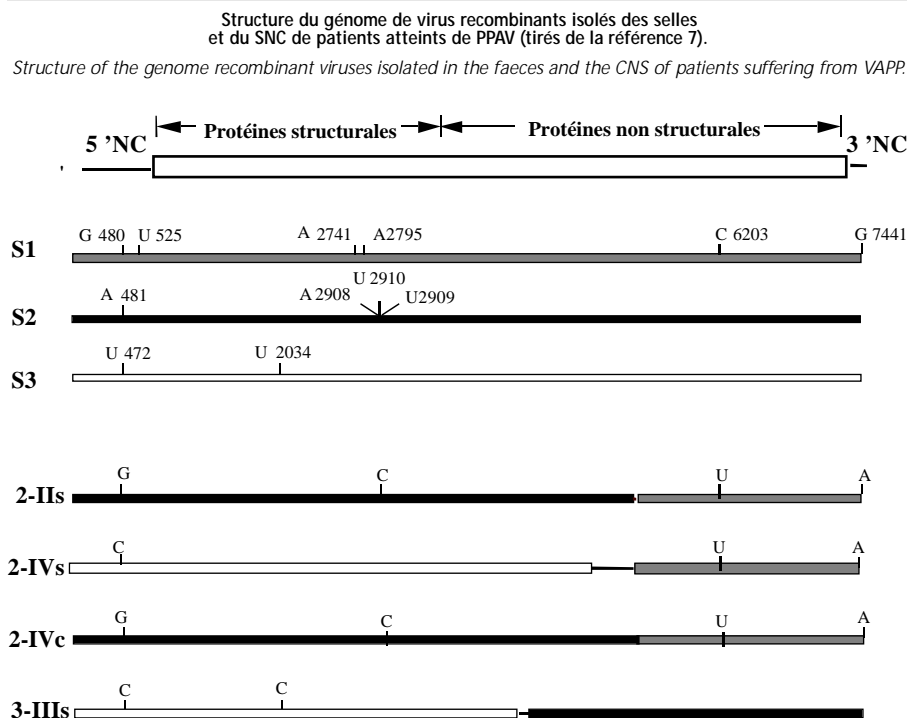
Curieusement, la dérive génétique des souches vaccinales s'effectue non seulement par des mutations ponctuelles mais également par des recombinaisons génétiques entre souches de poliovirus. En effet, l'analyse des souches issues de patients atteints de PPAV met en évidence une proportion considérable de génomes recombinants (50 % des souches de type 2 et 67 % des souches de type 3) (4, 7, 13). Il s'agit dans la majorité des cas de souches recombinantes intertypiques dont le génome est constitué de deux parties provenant chacune d'une souche vaccinale de sérotype différent. S'il est généralement admis que les mutations ponctuelles participent à l'acquisition d'avantages sélectifs, le rôle de la recombinaison génétique reste cependant à démontrer.

Nous avons entrepris récemment une analyse comparative, qualitative et quantitative, de souches isolées de vaccinés sains et de patients atteints de PPAV (4, 11). Les résultats indiquent

que, dans les deux cas, la recombinaison intertypique entre les trois sérotypes de PV du VPO est un événement fréquent. Plus de 50% des souches vaccinales apparaissent sous forme de recombinants intertypiques. L'analyse globale de la structure génomique des souches recombinantes n'a pas permis de mettre en évidence, à l'heure actuelle, de différences notables entre les souches recombinantes que l'on isole de vaccinés sains et celles qui proviennent de patients atteints de PPAV. Ces études ouvrent cependant la voie vers la compréhension des règles et mécanismes qui régissent la recombinaison chez le PV et les entérovirus. Les résultats indiquent ainsi clairement que certaines associations de segments génomiques sont fréquemment sélectionnées. De plus, la localisation grossière des sites de recombinaison (grâce à des tests RFLP) indique qu'ils sont localisés préférentiellement dans les zones du génome codant les protéines non structurales. Les facteurs à l'origine de ces particularités, tels que l'influence de la structure primaire ou secondaire des ARNs génomiques ou le rôle possible de facteurs de sélection agissant sur certains recombinants, sont en cours d'investigation. Des souches recombinantes entre PV vaccinal et souches sauvages ont également été mises en évidence (6) (GUILLOT et coll., soumis pour publication). Si, dans certains cas, la souche parentale de PV sauvage a pu être identifiée, dans d'autres cas il est possible que les séquences d'origine inconnue proviennent d'ENPV phylogénétiquement proches. Par ailleurs, l'étude de PV sauvages circulant en Inde suggère que la recombinaison génétique entre souches de génotypes différents est un facteur important d'évolution naturelle du PV.

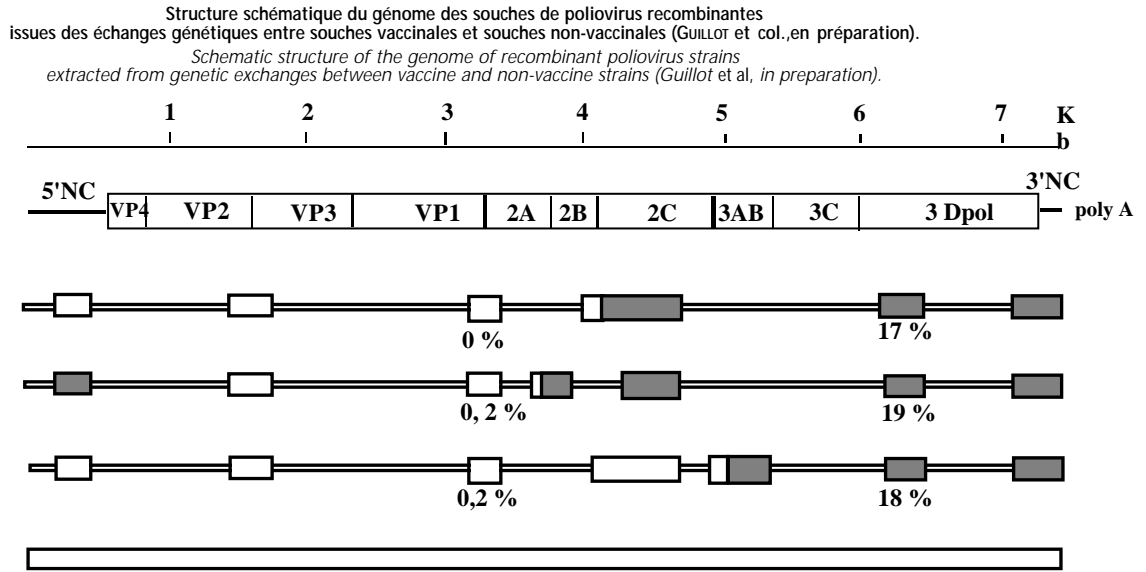
Ces études apportent un regard nouveau sur les mécanismes impliqués dans la variabilité génétique et l'évolution du PV. Le rôle des mutations ponctuelles dans la dérive génétique et phénotypique des souches est bien connu. L'absence de tout mécanisme de réparation, au cours de la réplication des virus à ARN, engendre un taux d'erreur élevé qui favorise

Figure 2.



La structure du génome du poliovirus et son organisation génétique sont présentées. Les régions 5' et 3' non-codantes (5'NC et 3'NC) du génome et la phase ouverte de lecture sont indiquées. La structure du génome des virus vaccinaux de poliovirus Sabin 1, 2 et 3 (S1, S2 et S3) et des virus recombinants est indiquée. Les segments génomiques correspondant aux virus parentaux sont représentés. Quelques loci et substitutions nucléotidiques qui différencient fréquemment les virus recombinants des virus parentaux sont indiqués.

Figure 3.



La structure du génome du poliovirus et son organisation génétique sont présentées. Les régions 5' et 3' non-codantes (5'NC et 3'NC) du génome sont indiquées. La phase ouverte de lecture du génome viral et les principales protéines virales engendrées après clivages protéolytiques sont représentées. Les segments génomiques des souches recombinantes analysés par séquençage sont indiqués par des rectangles vides pour les séquences dérivées de la souche vaccinale de type 2 (Sabin 2) et par des rectangles hachurés pour les séquences non vaccinales. Le pourcentage de divergence nucléotidique entre la souche étudiée et la souche Sabin 2 est indiqué pour certains segments génomiques.

l'apparition de souches aux caractères nouveaux. Le fait que les échanges génétiques entre souches de PV aient un caractère aussi fréquent paraît par contre plus surprenant. On peut émettre l'hypothèse que l'échange de "gènes" non structuraux ait un effet sur les caractéristiques des virus recombinants. La sélection fréquente de recombinants intertypiques au détriment des souches vaccinales originales suggère en effet que ces recombinants aient un avantage pour se multiplier dans l'intestin, et peut-être dans le SNC.

Un autre aspect de la recombinaison génétique chez les entérovirus concerne des échanges interspécifiques entre PV et ENPV. Les similitudes de séquences nucléotidiques entre souches de coxsackievirus A21 ou A24 et souches de PV suggèrent fortement que ces espèces aient évolué par recombinaison génétique interspécifique (8). D'autres travaux récents consistant à rechercher des similitudes de séquences entre 30 entérovirus différents confirment que les échanges génétiques entre espèces virales sont fort probablement un élément important de l'évolution de ce groupe de virus (22). La fréquence élevée des échanges génétiques entre entérovirus pourrait être liée au fait que ces virus se multiplient essentiellement au sein de la même niche écologique, le tractus digestif. Ils seraient ainsi amenés à se répliquer fréquemment dans une même cellule cible, condition *sine qua non* pour que des échanges de matériel génétique aient lieu.

Interférence entre entérovirus

Le fait que ces virus se multiplient dans la même niche écologique pourrait également être à l'origine des phénomènes d'interférence qui ont été constatés dès les premières campagnes de vaccination utilisant le VPO. Des interférences entre souches vaccinales ont ainsi été mises en évidence chez les vaccinés. Ce phénomène pourrait affecter l'efficacité du VPO: il existe en effet une excellente corrélation entre multiplication (excrétion) du virus chez le vacciné et séroconversion. L'interférence de la souche de type 2 à l'encontre de la souche de type 3 a ainsi été décrite récemment chez des enfants Maya (14). De plus, il semblerait que, dans certains cas, la présence d'autres entérovirus ou d'autres virus entériques

puisse interférer avec la multiplication des souches vaccinales du VPO chez les vaccinés (2, 14, 20, 24). Cela pourrait expliquer l'immunogénicité faible de la souche Sabin 3 dans les pays en voie de développement. Ces phénomènes d'interférence pourraient jouer dans les deux sens; en effet, la distribution intensive de VPO à des populations élargies, sur de courtes périodes, modifie au moins momentanément les populations d'entérovirus (19).

Vaccination avec le vaccin polio oral: quelles répercussions sur le monde des entérovirus?

Échanges génétiques et interférences entre entérovirus au sein du tractus digestif laissent craindre qu'une vingtaine d'années de vaccination mondiale intensive avec le VPO ne modifie, significativement, qualitativement et quantitativement les populations d'entérovirus. Les souches vaccinales utilisées systématiquement chez les nouveau-nés au cours de vaccinations de routine, et épisodiquement chez tout enfant de moins de 5 ans dans le cadre des journées nationales de vaccination, peuvent en effet avoir relégué les ENPV dans des domaines retranchés de leur niche écologique (9). Si ces hypothèses étaient vérifiées, on pourrait alors assister après arrêt de la vaccination et disparition de l'espèce poliovirus, à un redéploiement de ces populations virales au sein des domaines de leur niche écologique laissés vacants par le virus disparu. L'élimination du PV du tractus digestif risque de modifier certains facteurs favorisant la circulation et l'évolution des ENPV. Les facteurs génétiques et éventuellement écologiques qui favorisent l'évolution d'une souche d'entérovirus vers des caractères épidémiques et fortement pathogènes pour l'homme restent à déterminer.

Que craindre des entérovirus non-polio?

Depuis la mise en place de la prophylaxie contre la poliomyélite, peu d'évidences viennent étayer le fait que les entérovirus constituent un risque épidémique majeur. Cela est

en partie lié au fait que seul un faible pourcentage des personnes infectées par les entérovirus développe la maladie. De plus, malgré leur gravité, les épidémies à entérovirus non-polio (ENPV) présentent presque toujours un caractère limité dans l'espace et dans le temps. Une épidémie associée à une souche d'entérovirus 71 (300 000 cas estimés) et caractérisée par des syndromes "pieds - mains - bouche", mais aussi fréquemment par des méningites, encéphalites ou poliomyélites paralytiques, a sévi récemment à Taïwan (OMS information - fact sheet N° 174). Une autre souche d'entérovirus 71 a été à l'origine d'une épidémie sévère en Bulgarie; parmi 705 malades répertoriés en 1975, 545 cas de méningites et 149 cas de paralysies de type poliomyélique, dont 44 cas mortels, ont été dénombrés (23). C'est en revanche une souche d'échovirus 11 qui a occasionné en Hongrie, en 1989, une épidémie sévère (386 cas répertoriés). Celle-ci s'est répandue en quelques mois sur tout le territoire national et s'est soldée, suite à des syndromes hémorragiques, par 13 cas mortels chez les nourrissons (3). Ces quelques exemples laissent craindre l'émergence toujours possible de souches d'ENPV épidémiques comparables, par leur pathogénicité, aux souches sauvages de poliovirus.

Conclusion et perspectives

Dans la phase de pré-éradication de la poliomyélite qui s'amorce avec le nouveau millénaire, se posent ainsi deux problèmes de génétique et d'écologie virale qui pourraient compromettre l'éradication sinon amoindrir les bénéfices attendus. Pour pouvoir faire disparaître l'espèce poliovirus, il est en effet nécessaire de mieux connaître les capacités éventuelles des souches vaccinales à circuler à long terme dans l'environnement ou chez des personnes infectées de façon persistante. Dans le cas où cet aspect s'avèrerait problématique, il faudrait alors envisager des mesures particulières transitoires, comme l'utilisation de vaccin inactivé et de traitements antiviraux. Un autre problème est lié au fait que l'éradication du PV pourrait favoriser l'émergence de nouvelles souches d'ENPV épidémiques. Ces considérations conduisent les laboratoires impliqués dans la surveillance de la poliomyélite à s'intéresser non seulement à la détection des dernières souches sauvages mais également à la circulation des souches vaccinales, ainsi qu'à la mise en place des programmes de veille microbiologique pour les ENPV.

Remerciements

Les travaux du laboratoire ont été effectués grâce au financement que nous accordent la Délégation générale au réseau des Instituts Pasteur et Instituts associés (AC 98 entérovirus - AC 99 entérovirus), la Direction des recherches sur l'environnement (Recherche Environn. 6724), l'Organisation mondiale de la santé et la Communauté européenne. Nous remercions Florence COLBÈRE-GARAPIN pour la lecture critique du manuscrit.

Références bibliographiques

1. BLONDEL B, DUNCAN G, COUDERC T, DELPEYROUX F, PAVIO N, & COLBÈRE-GARAPIN F - Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells [Review]. *J Neurovirol*, 1998, **4**, 1-26.
2. CONTRERAS G - Effect of the administration of oral poliovirus vaccine on infantile diarrhoea mortality. *Vaccine*, 1989, **7**, 211-212.

3. EL-SAGEYER MM, SZENDROI A, HUTTER E, UJ M, SZUCS G *et al.* - Characterisation of an Echovirus type 11' (prime) epidemic strain causing haemorrhagic syndrome in newborn babies in Hungary. *Acta Virologica*, 1998, **42**, 157-166.
4. FURIONE M, GUILLOT S, OTELEA D, BALANANT J, CANDREA A & CRAINIC R - Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virology*, 1993, **196**, 199-208.
5. GEORGESCU MM, BALANANT J, MACADAM A, OTELEA D, COMBIESCU M *et al.* - Evolution of the Sabin type 1 Poliovirus in Humans - characterization of strains isolated from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol*, 1997, **71**, 7758-7768.
6. GEORGESCU MM, DELPEYROUX F & CRAINIC R - Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine nonvaccine recombinant Poliovirus. *J Gen Virol*, 1995, **76**, 2343-2348.
7. GEORGESCU MM, DELPEYROUX F, TARDYANIT M, BALANANT J, COMBIESCU M *et al.* - High diversity of poliovirus strains isolated from the central nervous system from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol*, 1994, **68**, 8089-8101.
8. HUGHES PJ, NORTH C, MINOR PD & STANWAY G - The complete nucleotide sequence of coxsackievirus A21. *J Gen Virol*, 1989, **70**, 2943-2952.
9. HULL HF, BIRMINGHAM ME, MELGAARD B & LEE JW - Progress toward global polio eradication. *J Infect Dis*, 1997, **175**:S, 4-9.
10. HULL BP & DOWDLE WR - Poliovirus surveillance-building the global polio laboratory network. *J Infect Dis*, 1997, **175**:S, 113-116.
11. IONNEDELCU NP, STREBEL M, TOMA F, BIBERIMOROEANU S, COMBIESCU M *et al.* - Sequential and combined use of inactivated and oral poliovirus vaccines - Dolj district, Romania, 1992-1994. *J Infect Dis*, 1997, **175**:S, 241-246.
12. KEW OM, SUTTER RW, NOTTAY BK, MCDONOUGH MJ, PREVOTS DR *et al.* - Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**, 2893-2899.
13. LIPSKAYA GY, MUZYCHENKO AR, KUITOVA OK, MASLOVA SV, EQUESTRE M *et al.* - Frequent isolation of intertypic poliovirus recombinants with serotype 2 specificity from vaccine-associated polio cases. *J Med Virol*, 1991, **35**, 290-296.
14. MALDONADO YA, PENA-CRUZ V, DE LA LUZ SANCHEZ M, LOGAN L, BLANDON S *et al.* - Host and viral factors affecting the decreased immunogenicity of Sabin type 3 vaccine after administration of trivalent oral polio vaccine to rural Mayan children. *J Infect Dis*, 1997, **175**, 545-553.
15. MELNICK JL - Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: BN FIELDS, DM KNIPE & PM HOWLEY (eds) - *Fields virology*, vol. 1. Raven publishers, Philadelphia, 1996, pp. 655-712.
16. MINOR PD - The molecular biology of poliovaccines. *J Gen Virol*, 1992, **73**, 3065-3077.
17. MINOR PD - Poliovirus. In: N. NATHANSON (ed) - *Viral Pathogenesis*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997, pp. 555-574.
18. MUIR P & ARCHARD LC - There is evidence for persistent enterovirus infections in chronic medical conditions in humans. *Rev Med Virol*, 1994, **4**, 245-250.
19. POYRY T, STENVIK M & HOVI T - Viruses in sewage waters during and after a poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**, 371-374.
20. SABIN AB - Vaccination against poliomyelitis in economically underdeveloped countries. *Bull OMS*, 1980, **58**, 141-157.
21. SABIN AB - Oral poliovirus vaccine: history of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. *J Infect Dis*, 1985, **151**, 420-436.
22. SANTTI J, HYYPIA T, KINNUNEN L & SALMINEN M - Evidence of recombination among enteroviruses. *J Virol*, 1999, **73**, 8741-8749.
23. SHINDAROV LM, CHUMAKOV MP, VOROSHILOVA MK, BOJINOV S, VASILENKO SM *et al.* - Epidemiological, clinical, and pathomorphological characteristics of epidemic poliomyelitis-like disease caused by Enterovirus 71. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*, 1979, **23**, 284-295.
24. SWARTZ TA, SKALSKA P, GERICHTER CB & COCKBURN WC - Non-polio virus interference with oral polio vaccine immunization: possible influence of physical climate and socio-economic status. *Adv Exp Med Biol*, 1972, **31**, 237-240.